

ANTICUERPOS ESPECÍFICAMENTE UNIDOS A LA PROTEÍNA ASM

Campo del Invento.

La presente revelación se relaciona con anticuerpos específicamente unidos al ácido esfingomielinasa (ASM).

Descripción de la Técnica Anterior.

El metabolismo esfingolípido regula la señalización celular normal, y los cambios anormales en el metabolismo esfingolípido causa varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer. La proteína del ácido esfingomielinasa (ASM), una enzima que regula el metabolismo esfingolípido, es una proteína expresada en casi todos los tipos de células y juega un papel importante en el metabolismo esfingolípido y el reemplazo de membrana celular.

En el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, se incrementa significativamente la actividad de la proteína ASM comparada

con aquella de la gente normal. En esta conexión, la Patente Coreana Nro. 10-1521117 revela que la inhibición de la actividad de la proteína ASM sobre-expresada o la inhibición de la expresión en la proteína ASM reprime la acumulación de amiloide- β y mejora la habilidad de aprendizaje y memoria y así puede tratar enfermedades neurodegenerativas. Se ha sabido últimamente que la actividad de la proteína ASM también aumenta en las enfermedades neurológicas, tales como depresión, y de ese modo la inhibición de la expresión o actividad de la proteína ASM es efectiva en la mejora de la depresión.

Sin embargo, no se han desarrollado las sustancias que inhiben directamente la expresión o actividad de la proteína ASM, y se han identificado algunos tipos de inhibidores que inhiben indirectamente la expresión de la proteína ASM. Por ejemplo, hay antidepresivos tricíclicos utilizados en el tratamiento de la depresión, y ejemplos de los mismos incluyen amitriptilina, desipramina, mipramina y similares. Aunque estos antidepresivos tricíclicos no se desarrollaron como inhibidores de la proteína ASM, varios estudios han demostrado que esos antidepresivos exhiben efectos inhibitorios de la proteína ASM. Un mecanismo farmacológico principal de antidepresivos tricíclicos es que la actividad de los mismos aumenta inhibiendo la recaptación de neurotransmisores en células nerviosas, y su acción

como un inhibidor de ASM fue confirmada como una acción subordinada. No obstante, los antidepresivos tricíclicos pueden actuar sobre el Sistema nervioso y las células nerviosas, causando efectos colaterales, tales como visión borrosa, aumento de sensibilidad a la luz y vómitos.

Resumen del invento

Por lo tanto, un aspecto de la presente revelación es proporcionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína ASM.

Otro aspecto de la presente revelación es proporcionar un método para producir el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Aún otro aspecto de la presente revelación es proporcionar el uso del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para detectar la proteína ASM.

De acuerdo con los aspectos, la presente revelación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a una proteína del ácido esfingomielinasa (ASM).

Además, la presente revelación proporciona un ácido nucleído que codifica el anticuerpo o el

fragmento de unión al antígeno del mismo.

Asimismo, la presente revelación proporciona un vector de expresión que incluye al ácido nucleído.

Asimismo, la presente revelación proporciona una célula huésped que incluye el ácido nucleído o el vector de expresión.

Además, la presente revelación proporciona un método para producir un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a una proteína ASM, incluyendo el método cultivar la célula huésped para producirle anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Además, la presente revelación proporciona una composición y juego para detectar una proteína ASM, cada uno incluyendo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Asimismo, la presente revelación proporciona un método para detectar la proteína ASM, incluyendo el método reaccionar una muestra con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno conforme a la presente revelación se une

específicamente a una proteína ASM con alta afinidad y así puede ser utilizada ventajosamente para detectarla proteína ASM o diagnosticar una enfermedad que ocurre debido a la sobre-expresión de la proteína ASM.

Breve descripción de los gráficos

La FIG. 1 ilustra un diagrama esquemático que muestra secuencias de aminoácido de regiones variables de cadena pesada y liviana de anticuerpos producidos conforme a un ejemplo de la presente revelación.

La FIG. 2 ilustra un gráfico que muestra la unión de los anticuerpos producidos conforme a un ejemplo de la presente revelación a la proteína ASM, tal como lo confirma el análisis ELISA.

La FIG. 3 ilustra un diagrama esquemático que muestra los sitios de unión en la proteína ASM, en un modelo de estructura de la proteína ASM, a los anticuerpos producidos conforme a un ejemplo de la presente revelación.

La FIG. 4 ilustra un mapa de intercambio de calor deuterio, en el dominio saposino de la proteína ASM, de cada uno de los anticuerpos producidos conforme a un ejemplo de la presente revelación.

Descripción detallada de los procedimientos ejemplares

De aquí en adelante, la presente revelación será descripta en detalle.

La presente revelación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo que se une específicamente a una proteína del ácido esfingomielinasa (ASM).

Como se usa en la presente, el término “proteína del ácido esfingomielinasa (ASM)” se refiere a una enzima, que es miembro de la familia esfingomielinasa (SMase) que regula el metabolismo esfingolípido. La proteína ASM cataliza la degradación de esfingomielina en ceramida y fosforilcolina, y puede clasificarse como una proteína ASM alcalina, neutral o acídica dependiendo del pH que exhibe actividad enzimática óptima de la misma.

La proteína ASM puede comprender cualquier tipo de proteína ASM que se conoce en la técnica. Específicamente, la proteína ASM puede derivar de un mamífero, más específicamente, un ser humano, un mono, una rata, o un ratón. Además, la proteína ASM puede contener todas las secuencias de aminoácido conocidas como la proteína ASM en la técnica. Por ejemplo, la proteína ASM puede ser un polipéptido que consiste de las secuencias de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 66 y 67, respectivamente, o

un ácido nucleído codificando la misma.

La proteína ASM puede ser una que tenga adición, eliminación o sustitución de por lo menos un aminoácido en la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 66 o 67 en la medida que retenga actividad biológica equivalente o correspondiente a aquella de la proteína ASM. La sustitución del aminoácido puede ser sustitución conservativa que se realiza dentro de un rango en el cual la sustitución no afecta o proporciona un efecto débil en la carga entera de la proteína, que es, polaridad o hidrofobicidad. La proteína ASM también puede tener por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, o por lo menos 99% de homología con las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NO: 66 y 67, respectivamente. La proteína ASM puede contener solamente una porción de la misma en la medida que la porción retenga actividad biológica equivalente o correspondiente a aquella de la proteína ASM.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína inmune que se une a un antígeno para interferir con una acción del antígeno o eliminar el antígeno. El anticuerpo puede incluir todos los tipos de anticuerpos conocidos en la técnica. Específicamente, el anticuerpo puede incluir IgM, IgD, IgG, IgA, IgE, que puede contener

cadenas pesadas formadas de genes μ , δ , γ , α , y ϵ codificando regiones constantes de cadena pesada, respectivamente. En tecnología de anticuerpo, normalmente se usa IgG. El IgG puede incluir un isotipo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, que puede ser diferente en términos de características estructurales y funcionales. El anticuerpo puede incluir todo los anticuerpos humanizados conteniendo una secuencia mínima derivada de un anticuerpo no humano, un anticuerpo humano conteniendo una secuencia derivada de un humano, o un anticuerpo quimérico conteniendo secuencias mezcladas derivadas de diferentes especies.

El IgG puede tener una estructura en forma de Y muy estable (alrededor de 150 kDa) hecho de dos proteínas de cadena pesada de alrededor de 50 kDa y dos proteína de cadena liviana de alrededor de 25 kDa. Las cadenas pesadas y livianas que constituyen anticuerpos pueden dividirse en regiones variables que tienen secuencias de aminoácido, que son diferentes entre anticuerpos, y regiones constantes que tienen secuencias de aminoácido que son iguales entre anticuerpos. Las regiones constantes de cadena pesada incluyen CH1, bisagra (H), dominios CH2, CH3, cada uno de los cuales está compuesto de dos hojas β y que pueden unirse a través de una unión intermolecular disulfido. Además, las regiones constantes de cadena liviana pueden incluir un dominio CL. Dos regiones variables de

cadena pesadas y cadenas livianas se combinan para formar un sitio de unión antígeno, y un sitio de unión antígeno puede estar presente en cada uno de los dos brazos en forma de Y. En el anticuerpo de longitud total, una región que puede unirse a un antígeno se denomina fragmento de unión al anticuerpo (Fab), y una región que no puede unirse a un antígeno se denomina fragmento cristizable (Fc), y el Fab y el Fc pueden conectarse mediante una bisagra. En un procedimiento de la presente revelación, el IgG puede ser un IgG derivado de ratón y, específicamente, puede incluir una región constante de cadena pesada de ratón IgG consistiendo de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 74 y una región constante de cadena liviana de ratón λ consistiendo de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 76. Alternativamente, el IgG derivado de ratón puede incluir una región constante de cadena pesada consistiendo de la secuencia nucleótido como se especifica en la SEC ID NO: 75 y una región constante de cadena liviana de ratón λ conteniendo una secuencia nucleótido como se especifica en la SEC ID NO: 77.

El anticuerpo conforme a la presente revelación puede incluir no solamente el anticuerpo de longitud total sino también un fragmento de unión antígeno del mismo. Específicamente, el fragmento de unión antígeno puede referirse a una región excepto la Fc que funciona para

transmitir el estímulo con un antígeno para una célula, un complemento o similar. Por ejemplo, el fragmento de unión antígeno del anticuerpo puede incluir todo el Fab, scFv, F(ab)2 y Fv, y también puede incluir un fragmento de anticuerpo de 3ra generación, tal como un anticuerpo de dominio simple y un mini cuerpo.

En un aspecto de la presente revelación, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno puede unirse a por lo menos un epítipo que se selecciona del grupo que consiste de un fragmento de aminoácido en posiciones 53 a 72, un fragmento aminoácido en posiciones 101 a 123, un fragmento aminoácido en posiciones 135 a 159, un fragmento aminoácido en posiciones 135 a 155, un fragmento aminoácido en posiciones 218 a 228 y un fragmento aminoácido en posiciones 259 a 269 del término N de la proteína ASM. La proteína ASM puede tener las características como se describe precedentemente. En un procedimiento de la presente revelación, el fragmento aminoácido en posiciones 53 a 72 del término N de la proteína ASM puede ser un polipéptido consistiendo de la secuencia aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 68 (TAINLGLKKEPNVARVGSVA); el fragmento de aminoácido en posiciones 101 a 123 del término N de la proteína ASM puede ser un polipéptido consistiendo de la secuencia aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 69

(VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH); el fragmento aminoácido en posiciones 135 a 159 del término N de la proteína ASM puede ser un polipéptido consistiendo de la secuencia aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 70 (PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF); el fragmento de aminoácido en posiciones 135 a 155 del término N de la proteína ASM puede ser un polipéptido consistiendo de la secuencia aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 71 (PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS); el fragmento de aminoácido en posiciones 218 a 228 del término N de la proteína ASM puede ser un polipéptido consistiendo de la secuencia aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 72 (SGLGPAGPFDM) y el fragmento aminoácido en posiciones 259 a 269 del término N de la proteína ASM puede ser un polipéptido consistiendo de la secuencia aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 73 (VRKFLGPVPVY). Es decir, conforme a otro aspecto de la presente revelación, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno puede unirse a por lo menos un epítipo seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos especificados en la SEC ID NOS: 68 a 73, respectivamente.

Como de usa en la presente, el término “epítipo” se refiere a un sitio específico de un antígeno que puede ser reconocido por un anticuerpo, y significa un determinante antigénico

al cual puede unirse específicamente un anticuerpo. El epítipo comúnmente se usa como el mismo significado dice, como un determinante o un determinante antigénico. El epítipo consiste de agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tal como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tiene usualmente estructura específica tridimensional como asimismo características de carga específicas.

En un aspecto de la presente revelación, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo puede incluir una región variable de cadena pesada comprendiendo a una cadena pesada CDR1 (X₁YX₂MS) consistiendo de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 61, una cadena pesada CDR2 (X₃IX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀YYADSVKG) que consiste de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 62, y una cadena pesada CDR3 seleccionada del grupo que contiene la cadena pesada CDR2 consistiendo de secuencias de aminoácido como se especifica en la SEC ID NOS: 27, 30, 33, 36, 39 y 42; y una región variable de cadena liviana incluyendo una cadena liviana CDR1 (X₁₁GSSSNIGX₁₂NX₁₃VX₁₄) consistiendo de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 63, una cadena liviana CDR2 (X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈RPS) consistiendo de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 64, y una cadena

liviana CDR3 ($X_{19}X_{20}WDX_{21}SLX_{22}X_{23}YV$) consistiendo de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO 65.

El término “región determinando complementariedad (CDR)” se refiere a una región hipervariable que está en las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana de un anticuerpo y tiene una secuencia de aminoácido diferente para cada anticuerpo, y significa una región que realmente se une a un antígeno. En una conformación tridimensional de un anticuerpo, la CDR tiene una forma de trayectoria circular en una superficie del anticuerpo, donde conforme a esa trayectoria circular, puede existir una región de infraestructura (FR) para soportar estructuralmente la CDR. Hay tres estructuras circulares en cada una de las cadenas pesada y liviana, y estas seis estructura circulares pueden combinarse entre sí para contactar directamente un antígeno. El sitio de unión antígeno que tiene seis estructuras circulares, CDRs, puede ser, por conveniencia, una cadena pesada CDR1, una cadena pesada CDR2, una cadena pesada CDR3, una cadena liviana CDR1, una cadena liviana CDR2 o una cadena liviana CDR3.

Por ejemplo, en la cadena pesada CDR1 (X_1YX_2MS) que consiste de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 61, X_1 y X_2 cada una puede seleccionarse

de aminoácidos acídicos y neutrales. Específicamente, X_1 puede ser un aminoácido acídico o neutral y X_2 puede ser un aminoácido neutral. Por ejemplo, cada uno de X_1 y X_2 puede seleccionarse del grupo que consiste de asparagina (Asn), glicina (Gly), serina (Ser), ácido aspártico (Asp), alanina (Ala), y tirosina (Tyr). Específicamente, X_1 puede ser asparagina, glicina, serina o ácido aspártico, y X_2 puede ser alanina o tirosina. En un procedimiento de la presente revelación, la cadena pesada CDR1 puede consistir de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 25, 28, 31, 34, 37, o 40.

En la cadena pesada CDR2 (X_3 IX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀YYADSVKG) que consiste de una secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 62, cada uno de X_3 a X_{10} puede seleccionarse de aminoácidos neutrales y básicos. Específicamente, cada uno de X_3 y X_4 a X_9 puede ser un aminoácido neutral, y X_{10} puede ser un aminoácido neutral o básico. Por ejemplo, cada uno de X_3 a X_{10} puede seleccionarse del grupo que consiste de glicina, leucina (Leu), alanina, serina, tirosina, prolina (Pro), asparagina, lisina (Lys) e isoleucina (Ile). Específicamente, X_3 puede ser glicina, leucina, alanina o serina; X_4 puede ser tirosina o serina; X_5 puede ser prolina o tirosina; X_6 puede ser asparagina o glicina; cada uno de X_7 y X_8 puede ser glicina o serina; X_9 puede ser asparagina o serina; y X_{10} puede ser lisina o isoleucina. En un

procedimiento de la presente revelación, la cadena pesada CDR2 puede consistir de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 26, 29, 32, 35, 38, o 41.

En la cadena liviana CDR1 ($X_{11}GSSSNIGX_{12}NX_{13}VX_{14}$) que consiste de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 63, cada uno de X_{11} a X_{14} puede seleccionarse de aminoácidos neutrales. Por ejemplo, cada uno de X_{11} a X_{14} puede seleccionarse del grupo que consiste de treonina (Thr), serina, asparagina, alanina, prolina y tirosina. Específicamente, X_{11} puede ser treonina o serina; X_{12} puede ser asparagina o serina; X_{13} puede ser alanina, prolina, treonina o tirosina; y X_{14} puede ser asparagina, tirosina, o serina. En un procedimiento de la presente revelación, la cadena liviana CDR1 puede consistir de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 43, 46, 49, 52, 55, o 58.

En la cadena liviana CDR2 ($X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}RPS$) consistiendo de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 64, cada uno de X_{15} a X_{18} pueden seleccionarse de aminoácidos ácidos, neutrales y básicos. Específicamente, cada uno de X_{15} y X_{16} pueden ser un aminoácido ácido o neutral, y X_{17} puede ser un aminoácido neutral, y X_{18} puede ser un aminoácido básico o neutral. Por ejemplo, cada uno de X_{15} a X_{18} puede seleccionarse del

grupo que consiste de tirosina, alanina, ácido aspártico, serina, asparagina, histidina (His), glutamina (Gln), y lisina. Específicamente, X₁₅ puede ser tirosina, alanina, ácido aspártico o serina; X₁₆ puede ser4 ácido aspártico o asparagina; X₁₇ puede ser serina o asparagina; y X₁₈ puede ser histidina, glutamina o lisina. En un procedimiento de la presente revelación, la cadena liviana CDR2 puede consistir de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 44, 47, 50, 53, 56, o 59.

En la cadena liviana CDR3 (X₁₉X₂₀WDX₂₁SLX₂₂X₂₃YV) consistiendo de la secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 65, cada uno de X_{19a} X₂₃ pueden seleccionarse de aminoácidos neutrales. Por ejemplo, cada uno de X_{19a} X₂₃ puede seleccionarse del grupo que consiste de glicina, alanina, serina, treonina, tirosina, ácido aspártico y asparagina. Específicamente, X₁₉ puede ser glicina o alanina; X₂₀ puede ser alanina, serina o treonina; X₂₁ puede ser tirosina, serina, alanina o ácido aspártico; X₂₂ puede ser serina o asparagina; y X₂₃ puede ser alanina o glicina. En un procedimiento de la presente revelación, la cadena liviana CDR3 puede consistir de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 45, 48, 51, 54, 57 o 60.

En otro aspecto de la presente revelación, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del

mismo podrá incluir: una región variable de cadena pesada incluyendo, una cadena pesada CDR1 seleccionada del grupo que consiste de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NOS: 25, 28, 31, 34, 37 y 40, respectivamente, una cadena pesada CDR2 seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 26, 29, 32, 35, 38 y 41, respectivamente, y una cadena pesada CDR3 seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 27, 30, 33, 36, 39 y 42, respectivamente; y una región variable de cadena liviana incluyendo, una cadena liviana CDR1 seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 43, 46, 49, 52, 55 y 58, respectivamente, una cadena liviana CDR2 seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 44, 47, 50, 53, 56 y 59, respectivamente, y una cadena liviana CDR3 seleccionada del grupo que consiste de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 45, 48, 51, 54, 57 y 60, respectivamente.

Además, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo podrá incluir: una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo compuesto de, una región variable de

cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 25, 26 y 27, respectivamente, una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 28, 29 y 30, respectivamente, una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 31, 32 y 33, respectivamente, una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 34, 35 y 36, respectivamente, una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 37, 38 y 39, respectivamente, y una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 40, 41 y 42, respectivamente; y una región variable de cadena liviana seleccionada del grupo compuesto de, una región variable de cadena liviana incluyendo las

cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 43, 44y 45, respectivamente, una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 46, 47 y 48, respectivamente, una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 49, 50 y 51, respectivamente, una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 52, 53 y 54, respectivamente, una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 55, 56 y 57, respectivamente, y una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 58, 59 y 60, respectivamente.

Asimismo, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo podrá incluir: una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3

consistiendo de las secuencias de aminoácido como se especifica en la SEC ID NOS: 25, 26 y 27, respectivamente, y una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 43, 44 y 45, respectivamente; una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 28, 29 y 30, respectivamente, y una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 46, 47 y 48, respectivamente; una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 31, 32 y 33, respectivamente, y una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 t CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 49, 50 y 51, respectivamente; una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 34, 35 y 36, respectivamente, y una región variable de cadena

liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 52, 53 y 54, respectivamente; una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 37, 38 y 39, respectivamente, y una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 55, 56 y 57, respectivamente; o una región variable de cadena pesada incluyendo las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 40, 41 y 42, respectivamente, y una región variable de cadena liviana incluyendo las cadenas livianas CDR1, CDR2 y CDR3 consistiendo de las secuencias de aminoácidos como se especifica en la SEC ID NOS: 58, 59 y 60, respectivamente.

Por ejemplo, la región variable de cadena pesada puede ser un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 o 11, y la región variable de cadena liviana puede ser un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se especifica en la SEC ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 o 23.

Además, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo conforme a la presente revelación puede modificarse en la forma necesaria. Específicamente, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo puede modificarse mediante conjugación, glicosilación, marcación o una combinación de los mismos. Específicamente, el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo puede modificarse con peroxidadas de rábano picante (HRP), una fosfatasa alcalina, hapteno, biotina, estreptavidina, una sustancia fluorescente, una sustancia radioactiva, un punto cuántico, polietilenglicol (PEG), un rótulo de histidina o similar. El anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo también puede conjugarse con otro medicamento en la forma necesaria.

El anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo puede producirse conforme a un método de producción de anticuerpo monoclonal conocido en la técnica, y el método de producción puede ser modificado en forma apropiada por una persona imbuida en la técnica.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser producido preparando híbrido mas mediante el uso de linfocitos B obtenidos de un animal inmunizado con un antígeno, o puede producirse mediante tecnología de exhibición de fagos.

Asimismo, la presente revelación proporciona un ácido nucleído codificando el anticuerpo o

fragmento de unión antígeno del mismo.

Un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo codificado por el ácido nucleído conforme a la presente revelación puede tener las características que se describen precedentemente. En la medida que se conozca una secuencia de aminoácido constituyendo el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo conforme a la presente revelación, también resultará obvio el ácido nucleído codificando la misma para una persona imbuida en la técnica. La secuencia de ácido nucleído puede tener por lo menos la adición, eliminación o sustitución de un nucleótido, en la medida que se retenga la actividad del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno traducido al respecto.

Por ejemplo, un ácido nucleído codificando una región variable de cadena pesada incluida en el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo conforme a la presente revelación puede ser un polinucleótido consistiendo de la secuencia nucleótido que se especifica en la SEC ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 o 12; y un ácido nucleído codificando una región variable de cadena liviana incluido en el mismo puede ser un polinucleótido consistiendo de una secuencia nucleótido que se especifica en la SEC ID NO: 14, 16, 18, 20, 22 o 24.

Asimismo, la presente revelación proporciona un vector de expresión que incluye el ácido

nucleído.

El ácido nucleído incluido en el vector de expresión conforme a la presente revelación puede codificar el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo teniendo las características arriba descritas.

Como se usa en la presente, el término “vector de expresión” es un medio para expresar un gen objetivo en una célula huésped, y puede incluir todo un vector plásmido, un vector cósmido, un vector bacteriófago, un vector viral y similares. El vector de expresión puede incluir elementos necesarios para preparar el péptido del ácido nucleído en el mismo. Específicamente, el vector de expresión puede incluir una secuencia de señalización, un origen de replicación, un gen marcador, un promotor, una secuencia determinación de transcripción y similares. El ácido nucleído codificando el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo conforme a la presente revelación puede ser operativamente ligado al promotor.

Como ejemplo, un vector de expresión utilizado en células procarióticas puede incluir un promotor para transcripción, un sitio de unión al ribosoma para iniciación de traslación y secuencias de terminación para transcripción y traslación. El vector de expresión utilizado en

células eucarióticas puede incluir un promotor y secuencia de poliadenilación derivada de un mamífero o de un virus mamífero.

Todos los genes marcadores conocidos en la técnica pueden ser usados como un gen marcador incluido en el vector de expresión, y pueden ser específicamente un gen resistente al antibiótico. Específicamente, el gen resistente al antibiótico puede ser un gen exhibiendo resistencia a los antibióticos incluyendo ampicilina, gentamicina, carbenicilina, cloranfenicol, estreptomicina, canamicina, neomicina, tetraciclina y similares.

Además, la presente revelación proporciona una célula huésped incluyendo el ácido nucleído o el vector de expresión.

El ácido nucleído o el vector de expresión incluido en la célula huésped conforme a la presente revelación podrá tener las características que se describen precedentemente.

Como ejemplo, el ácido nucleído puede codificar el anticuerpo o el fragmento de unión antígeno del mismo que específicamente se une a la proteína ASM conforme a la presente revelación, y el vector de expresión puede incluir el ácido nucleído como se describe precedentemente.

Todos los tipos de células conocidos que se usan para producir anticuerpos o fragmentos de

unión antígeno de los mismos en la técnica pueden ser usados como una célula huésped. Específicamente, la célula huésped puede ser una célula procariótica, levadura o una célula eucariótica. Ejemplos de célula procariótica pueden incluir *E. coli*, las cepas genus *Bacillus*, la cepa genus *Streptomyces*, la cepa genus *Pseudomonas*, la cepa genus *Staphylococcus* y similares, y ejemplos de levadura pueden incluir *Saccharomyces cerevisiae* y similares. Ejemplo de célula eucariótica puede incluir COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/DHFR, CV1, HEK293, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PERC6, SP2/0, NS-0, U20S, HT1080 y similares.

La célula huésped puede ser transducida con el ácido nucleído o vector de expresión como se describe precedentemente conforme a un método conocido en la técnica. Específicamente, la transducción puede ser realizada mediante transfección transitoria, microinyección, transducción, infusión celular, precipitación de fosfato de calcio, transfección inducida por liposoma, transfección inducida por dextrano DEAE, transfección inducida por polibreno, electroporación, una pistola de genes o similares. Los métodos también pueden ser modificados adecuadamente por una persona imbuida en la técnica.

Asimismo, la presente revelación proporciona un método para producir un anticuerpo o un fragmento de unión antígeno del mismo que se une específicamente a una proteína ASM, incluyendo el método de cultivar la célula huésped para producir el anticuerpo o el fragmento de unión antígeno del mismo.

Un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo obtenido mediante el método de producción conforme a la presente revelación puede tener las características que se describen precedentemente.

El cultivo puede ser realizado usando un medio de cultivo apropiado dependiendo del tipo de célula huésped usado para producción, y puede contener suplementes apropiados en la forma necesaria. El cultivo puede realizarse en un ambiente apropiado dependiendo del tipo de célula huésped.

El método de producción conforme a la presente revelación puede incluir también recubrir un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo producido en la célula huésped. El recubrimiento puede ser realizado conforme a un método conocido en la técnica, donde el cultivo puede ser modificado en la forma necesaria por una persona imbuida en la técnica. Por ejemplo, el recubrimiento puede ser realizado removiendo las impurezas a través de

centrifugación o ultrafiltración, y puede ser realizado mediante más purificación y obtener el producto resultante por cromatografía o similar. La cromatografía puede incluir cromatografía de afinidad, cromatografía de cationes, cromatografía de interacción hidrofóbica y similares.

Asimismo, la presente revelación proporciona una composición y un juego para detectar una proteína ASM, incluyendo cada uno el anticuerpo o el fragmento de unión antígeno del mismo.

El anticuerpo o el fragmento de unión antígeno del mismo incluido en la composición y juego para detectar una proteína ASM conforme a la presente revelación podrá tener las características descritas precedentemente.

Además, la composición puede incluir un ligando que puede unirse específicamente al anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo conforme a la presente revelación. El ligando puede ser un conjugado rotulado con un detector, tal como una enzima cromogénica, una sustancia fluorescente, un radioisótopo, un coloide o similar, o puede tratarse con estreptavidina o avidina. La composición de detección de la presente revelación también puede incluir, además de los reactivos que se describen precedentemente, agua destilada o un amortiguador para mantener establemente la estructura de la misma.

El juego puede unirse a un sustrato sólido para facilitar las etapas subsiguientes, tal como lavar el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo contenido en el mismo, o separar el complejo. Se puede utilizar una resina sintética, nitrocelulosa, un sustrato de vidrio, un sustrato metálico, una fibra de vidrio, una micro esfera, o una micro-bolita como un sustrato sólido. Además, se puede utilizar poliéster, cloruro de polivinilo, poliestireno, polipropileno, PVDF o nylon como una resina sintética.

El juego puede ser fabricado mediante el método de fabricación convencional conocido para una persona imbuida en la técnica, y también puede incluir un amortiguador, un estabilizador, una proteína inactiva y similares.

Asimismo, la presente revelación proporciona un método para detectar una proteína ASM, incluyendo el método una etapa de reacción de una muestra con el anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo.

Un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo utilizado en el método de detección de la proteína ASM conforme a la presente revelación puede tenerlas características que se describen precedentemente.

La muestra puede incluir todas clases de muestras que se utilizan para detectarla proteína

ASM. Un método para detectar una proteína objetivo usando un anticuerpo o fragmento de unión antígeno del mismo es bien conocido en la técnica, y el método puede realizarlo una persona imbuida en la técnica mediante modificación apropiada en la forma necesaria.

De aquí en adelante, la presente revelación se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes procedimientos ejemplares son meramente para ilustrar la presente revelación, y no pretenden limitar el alcance de la presente revelación. Cualquier procedimiento que tenga sustancialmente la misma constitución que la idea técnica descrita en las reivindicaciones de la revelación y logre los mismos efectos de acción deberá incluirse en el alcance técnico de la presente revelación.

Ejemplo 1: Producción de Anticuerpos Específicamente Unidos a la Proteína del Ácido Esfingomielinasa (ASM).

Los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína ASM humana (SEC ID NO: 66) y a la proteína ASM de ratón (SEC ID NO: 67) se produjeron como sigue.

Específicamente, los fagos con scFv específicamente unidos a la proteína ASM humana o a la proteína ASM de ratón se seleccionaron realizando un paneo mediante un método típico usando una proteína ASM recombinante humana y de ratón y biblioteca de fago scFv

humana sintética. Se analizaron secuencias de ácido nucleído codificando el scFv seleccionado, y se identificaron secuencias de aminoácido traducidas del mismo. Se produjeron vectores de expresión de modo tal que una región constante de cadena pesada de ratón y una región constante λ de cadena liviana de ratón consistiendo de secuencias nucleótido como se especifica en la SEC ID NOS: 75 y 77, respectivamente, se unieran al término carboxide la región constante de cadena pesada y de la región constante de cadena liviana de cada una de las secuencias scFv identificadas. Las secuencias de aminoácido y secuencias de ácido nucleído de las regiones variables de cadena pesada constituyendo scFv contenido en los vectores de expresión producidos se muestran en la Tabla 1, y las secuencias de aminoácido y secuencias de ácido nucleído de las regiones constantes de cadena liviana de los mismos se revelan en la Tabla 2.

TABLA 1

Anticuerpo #	Secuencia	Secuencia Número
#9101	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS WVRQAPGKGLEWVSGIYPNGGNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNAYRFDY WGQGTLVTVSS	SEC ID NO: 1

	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTACCTTTAGCAATTATGCTATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGGGATCTATCCTAATGGTGGTAAT AAATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCAC CATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAAAAATGCTTATCGTTTCGA CTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC TCA	SEC ID NO: 2
#9102	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMS WVRQAPGKGLEWVSLISPGSGSIYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSWHHFDYW GQGTLVTVSS	SEC ID NO: 3
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTACCTTTAGCGGTTATTATATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCATTGATCTCTCCTGGTAGTGGTAGT ATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCACC	SEC ID NO: 4

	ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAAATCTTGGCATCATTTCTGA CTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC TCA	
#9104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMS WVRQAPGKGLEWVSGIYYGSGNIYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTPGFDYW GQGTLVTVSS	SEC ID NO: 5
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTACCTTTAGCAATTATTATATGAG CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCAGGGATCTATTATGGTAGTGGTAATA TATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCACCA TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGAGATACGCCTGGGTTCGAC TACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCT CA	SEC ID NO: 6
#9108	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS	SEC ID NO: 7

	WVRQAPGKGLEWWSAIYPGGGSIYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVLGLTPKP FDYWGQGTLVTVSS	
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTACCTTTAGCAATTATGCTATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCGATCTATCCTGGTGGTGGTAGT ATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGATGTTTTGGGTCTGAC TCCTAAGCCGTTGCGACTACTGGGGCCAGGGTACA CTGGTCACCGTGAGCTCA	SEC ID NO: 8
#9113	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYYMS WVRQAPGKGLEWVSSISPGGSSIYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGASLFDYW GQGTLVTVSS	SEC ID NO: 9
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTACCTTTAGCAGTTATTATATGA	SEC ID NO: 10

	GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCATCGATCTCTCCTGGTGGTAGTAGT ATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAAAGGGGCGTCTCTGTTCGA CTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC TCA	
#9123	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSDYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISYGGGNIYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGMCTRR QCYDYGMDVWGQGTLVTVSS	SEC ID NO: 11
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG TACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCCGGATTACCTTTAGCGATTATGCTATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AGTGGGTCTCAGCGATCTCTTATGGTGGTGGTAAT ATATATTACGCTGATTCTGTAAAAGGTCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGAGTTGGTGGTATGTGTAC	SEC ID NO: 12

	TAGGCGTCAGTGTTATTATGATTATGGTATGGACG TCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTC A	
--	--	--

TABLA 2

Anticuerpo#	Secuencia	SEC ID NRO
#9101	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVSWY QQLPGTAPKLLIYADSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI GGLRSEDEADYYCGSWDYSLNAYVFGGGTKLTVL	SEC ID NO: 13
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGG GACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTG GCTCTTCATCCAATATTGGCAATAATTATGTCTCCTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATGCTGATAGTAAGCGGCCAAGCGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG CCTCGCTGGCCATCGGTGGGCTCCGGTCCGAGGAT GAGGCTGATTATACTGTGGTTCTTGGGATTATAGCC TGAATGCTTATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTA CGGTCCTA	SEC ID NO: 14
#9102	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNPVYWY	SEC ID NO: 15

	QQLPGTAPKLLIYANNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAAWDSSLSGYVFGGGTKLTVL	
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGG GACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAAGT GCTCTTCATCTAATATTGGCAATAATCCTGTCTACTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATGCTAATAATCAGCGGCCAAGCGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGAT GAGGCTGATTATTACTGTGCTGCTTGGGATTCTAGC CTGAGTGGTTATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTT ACGGTCCTA	SEC ID NO: 16
#9104	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGNNAVNWY QQLPGTAPKLLIYYDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCGAWDYSLSAYVFGGGTKLTVL	SEC ID NO: 17
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGG GACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAAGT GCTCTTCATCTAATATTGGCAATAATGCTGTCAACTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATTATGATAGTCATCGGCCAAGCGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG	SEC ID NO: 18

	CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGAT GAGGCTGATTATTACTGTGGTGCTTGGGATTATAGC CTGAGTGCTTATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTT ACGGTCCTA	
#9108	QSVLTQPPSASGTPGQRVTLSTGSSSNIGSNTVYWY QQLPGTAPKLLIYANSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCGSWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	SEC ID NO: 19
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGG GACCCCCGGGCAGAGGGTCACCCTCTCTTGACTG GCTCTTCATCTAATATTGGCAGTAATACTGTCTACTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATGCTAATAGTCAGCGGCCAAGCGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGAT GAGGCTGATTATTACTGTGGTTCTTGGGATTATAGCC TGAGTGGTTATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTA CGGTCCTA	SEC ID NO: 20
#9113	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVSWY QQLPGTAPKLLIYSDNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCGTWDASLNAYVFGGGTKLTVL	SEC ID NO: 21
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGTGGG	SEC ID NO: 22

	ACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTGG CTCTTCATCTAATATTGGCAATAATGCTGTCTCCTGG TACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCT CATCTATTCTGATAATAAGCGGCCAAGCGGGGTCCC TGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGC CTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATG AGGCTGATTATTACTGTGGTACTTGGGATGCTAGCC TGAATGCTTATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTTA CGGTCCTA	
#9123	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWY QQLPGTAPKLLIYDNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCGTWDDSLSGYVFGGGTKLTVL	SEC ID NO: 23
	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCTAGCGG GACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTAGTG GCTCTTCATCTAATATTGGCAGTAATACTGTCAACTG GTACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCC TCATCTATGATAATAGTAAGCGGCCAAGCGGGGTCC CTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAG CCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAAGAT GAGGCTGATTATTACTGTGGTACTTGGGATGATAGC CTGAGTGGTTATGTCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTT	SEC ID NO: 24

	ACGGTCCTA	
--	-----------	--

El vector de expresión empleado era un vector de expresión mamífero. Los vectores de expresión producidos se transformaron en la línea celular CHO o HEK293 para producir anticuerpos de longitud total que se unen a la proteína ASM humana o tanto a la proteína ASM humana como a la de ratón.

Ejemplo 2: Determinación para Determinar Regiones de Complementariedad (CDRs)

Las regiones para determinar complementariedad en los fragmentos scFv producidos se identificaron mediante un método convencional, y como resultado, las secuencias CDR de las regiones variables de cadena pesada se muestran en la Tabla 3 y las secuencias CDR de las regiones variables de cadena liviana se muestran en la Tabla 4.

TABLA 3

Anticuerpo#	CDR	Secuencia	SEC ID NRO
#9101	CDR1	NYAMS	SEC ID NO: 25
	CDR2	GIYPNGGNKYYADSVKG	SEC ID NO: 26
	CDR3	NAYRFDY	SEC ID NO: 27

#9102	CDR1	GYYSMS	SEC ID NO: 28
	CDR2	LISPGSGSIYYADSVKG	SEC ID NO: 29
	CDR3	SWHHFDY	SEC ID NO: 30
#9104	CDR1	NYYSMS	SEC ID NO: 31
	CDR2	GIYYGSGNIYYADSVKG	SEC ID NO: 32
	CDR3	DTPGFDY	SEC ID NO: 33
#9108	CDR1	NYAMS	SEC ID NO: 34
	CDR2	AIYPGGGSIYYADSVKG	SEC ID NO: 35
	CDR3	DVLGLTPKPFDY	SEC ID NO: 36
#9113	CDR1	SYYSMS	SEC ID NO: 37
	CDR2	SISPGGSSIYYADSVKG	SEC ID NO: 38
	CDR3	GASLFDY	SEC ID NO: 39
#9123	CDR1	DYAMS	SEC ID NO: 40
	CDR2	AISYGGGNIYYADSVKG	SEC ID NO: 41
	CDR3	VGGMCTRRQCYDYGMDV	SEC ID NO: 42

TABLA 4

Anticuerpo#	CDR	Secuencia	SEC ID NRO
#9101	CDR1	SGSSSNIGNNYVS	SEC ID NO: 43
	CDR2	ADSKRPS	SEC ID NO: 44

	CDR3	GSWDYSLNAYV	SEC ID NO: 45
#9102	CDR1	SGSSSNIGNNPVY	SEC ID NO: 46
	CDR2	ANNQRPS	SEC ID NO: 47
	CDR3	AAWDSSLSGYV	SEC ID NO: 48
#9104	CDR1	TGSSSNIGNNAVN	SEC ID NO: 49
	CDR2	YDSHRPS	SEC ID NO: 50
	CDR3	GAWDYSLSAYV	SEC ID NO: 51
#9108	CDR1	TGSSSNIGSNTVY	SEC ID NO: 52
	CDR2	ANSQRPS	SEC ID NO: 53
	CDR3	GSWDYSLSGYV	SEC ID NO: 54
#9113	CDR1	SGSSSNIGNNAVS	SEC ID NO: 55
	CDR2	SDNKRPS	SEC ID NO: 56
	CDR3	GTWDASLNAYV	SEC ID NO: 57
#9123	CDR1	SGSSSNIGSNTVN	SEC ID NO: 58
	CDR2	DNSKRPS	SEC ID NO: 59
	CDR3	GTWDDSLSGYV	SEC ID NO: 60

Ejemplo experimental 1: Confirmación de Unión a la Proteína ASM.

Se analizó mediante ELISA la unión del anticuerpo producido, específicamente la unión a la

proteína ASM, a la proteína ASM.

Primero, se agregaron 100 µl de 1 µg/mL de proteína ASM recombinante humana(Sistemas R&D) a una bandeja de variedad múltiple de 96 pocillos (Thermo científica) y se dejó a 4°C durante 16 horas para revestir la bandeja. Luego, se agregaron 200 µl de PBS conteniendo 5% BSA a la bandeja revestida, seguido de incubación a 37°C durante alrededor de 2 horas, y luego se lavó la bandeja tres veces con PBS conteniendo 0.05% Tween 20. Se trató la bandeja con el anticuerpo anti-ASM a 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, o 100 nM, seguido de incubación a 37°C durante alrededor de 1 hora. Después de la incubación, se lavó tres veces la bandeja con PBS conteniendo 0.05% Tween, y se agregaron 100 µl de anticuerpo IgG-HRP cabra-anti-ratón(Jackson Immunoresearch) como un anticuerpo secundario. Después de la incubación nuevamente a 37°C durante alrededor de 1 hora, se lavó tres veces la bandeja con PBS conteniendo 0.05% Tween. Luego, se agregaron 100 µl de un sustrato de tetrametilbencidina (TMB), seguido de incubación a temperatura ambiente durante alrededor de 5 minutos adicionales, y después la reacción se terminó con 100 µl de una solución de ácido sulfúrico 2N, y se midió la absorbancia en una longitud de onda de 450 nm. Como resultado, la absorbancia medida se mostró en la FIG. 2

y los valores EC_{50} de anticuerpos calculados de la absorbancia de muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Anticuerpo#	EC_{50} (nM)
#9101	0.0815
#9102	0.0954
#9104	1.948
#9108	0.3269
#9123	0.7578

Como se muestra en la FIG. 2, los cinco tipos de anticuerpos producidos precedentemente se unieron a la proteína ASM en una manera dependiente de la concentración. En particular, como se muestra en la Tabla 5, el anticuerpo #9101 mostró el valor EC_{50} más bajo y de ese modo tuvo la capacidad de unión más alta a la proteína ASM.

Ejemplo Experimental 2: Confirmación de Afinidad de Unión con la Proteína ASM.

La afinidad de unión de los anticuerpos producidos, específicamente la unión a la proteína

ASM, con la proteína ASM y la dinámica interactiva entre las mismas se midieron usando un sistema Octet® QK384 (Pall Life Sciences).

Primero, se trataron 20 mM de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida clorhidrato (EDC) y 40 mM de soluciones N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) en un sensor AR2G (ForteBio) para activar los grupos carboxilo. Mientras tanto, se prepararon 10 µg/mL de proteína ASM recombinante humana o 2.5 µg/mL de proteína ASM recombinante de ratón mediante dilución en una solución de 10 mM de acetato de sodio (pH 5.0) (ForteBio). La solución que tenía la proteína ASM diluida se agregó al sensor AR2G que tenía grupos carboxilo activados para obtener el sensor AR2G en el cual se inmovilizó la proteína ASM recombinante humana o de ratón. Se agregó 1 M de etanolamina (ForteBio) al sensor en el cual se inmovilizó la proteína ASM obtenida, para desactivar los grupos carboxilo restantes no reaccionados. Los anticuerpos producidos en el Ejemplo 1 se agregaron en concentraciones de 0.4, 2 o 10 nM, y la fase de asociación del producto de reacción se observó durante hasta alrededor de 900 segundos. Después de eso, se agregó un amortiguador cinético 1× (ForteBio), y la fase de desasociación del producto de reacción se observó durante alrededor de 1,200 segundos. La constante de asociación (K_{on}), constante de desasociación (K_{dis}), y constante de equilibrio

de desasociación (KD) de cada anticuerpo se determinó usando el programa de análisis Octet® (PallLife® Sciences). Como resultado, los resultados del análisis para la proteína ASM recombinante humanase exhiben en la Tabla 6, y los resultados del análisis para la proteína ASM recombinante de ratón se exhiben en la Tabla 7.

TABLA 6

Anticuerpo#	KD(M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)	RMax	R ² Total
#9101	1.16E-09	6.26E+05	7.28E-04	0.4527	0.9861
#9102	2.52E-10	4.16E+05	1.05E-04	0.8652	0.997
#9104	2.09E-10	3.92E+05	8.18E-05	0.3324	0.9759
#9108	1.19E-10	2.49E+05	2.96E-05	0.45	0.999
#9113	5.64E-10	1.16E+06	6.56E-04	0.2868	0.9635

TABLA 7

Anticuerpo#	KD(M)	Kon(1/Ms)	Kdis(1/s)	RMax	R ² Total
#9101	4.25E-11	3.76E+06	1.59E-04	0.0185	0.5527
#9102	4.98E-10	4.89E+05	2.43E-04	0.4281	0.9944
#9104	6.38E-10	3.10E+05	1.98E-04	0.7027	0.9971
#9108	3.39E-09	4.59E+05	1.56E-03	0.3921	0.9865

#9113	<1.0E-12	1.00E+06	<1.0E-07	0	0
-------	----------	----------	----------	---	---

Como se exhibe en la Tabla 6, cinco tipos de anticuerpos producidos en el Ejemplo 1 se unieron a la proteína ASM humana con una afinidad de unión de 10^{-10} a 10^{-9} M. Mientras tanto, como se exhibe en la Tabla 7, solamente los anticuerpos #9102, #9104 y #9108 exhibieron una afinidad de unión de 10^{-10} a 10^{-9} M a la proteína ASM de ratón.

Ejemplo Experimental 3: Identificación de Determinante Antigénica de la Proteína ASM.

Se investigaron los sitios de la proteína ASM a los cuales se unieron los anticuerpos del presente invento, es decir, determinantes antigénicos mediante espectrometría de masa de intercambio de hidrógeno deuterio (HDX-MS).

Primero, se diluyeron serialmente los anticuerpos 1,000 $\mu\text{g/mL}$ de proteína ASM, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ #9101 mIgG1, 1,250 $\mu\text{g/mL}$ #9102 mIgG2, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ #9104 mIgG4, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ #9108 mIgG1, 3,300 $\mu\text{g/mL}$ #9113 mIgG1, o 2,932 $\mu\text{g/mL}$ #9123 mIgG1 2-veces para preparar diluciones hasta 128 veces. Luego, se tomó 1 μL de cada una de las diluciones preparadas, y se mezclaron con una cantidad igual de 10 mg/mL de matriz de ácido sinapínico (K200 MALDI kit, CovalX), y se dispensó 1 μL de la mezcla en bandejas SCOUT

384 MALDI, seguido de cristalización a temperatura ambiente. Después, se midieron los cristales usando un espectrómetro de masa MALDI. Para los datos entrecruzados para análisis de interacción no covalente, se mezcló 1 µl de cada una de las diluciones 128 veces con una cantidad igual de un reactivo estabilizante de 2 mg/ml K200 (K200 juego MALDI, CovalX), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completar la reacción, se sometió 1 µl de la solución mezclada a medición usando un espectrómetro de masa MALDI, y los resultados de la medición se analizaron en un modo MS de masa alta MALDI. Como resultado, las secuencias péptido de los sitios que se identificaron que tenían diferencia significativa de incorporación de uterino en la proteína ASM se muestran en la Tabla 8, y los modelos de estructura de proteína ASM humana indicando los sitios de unión en la proteína ASM a cada anticuerpo se muestran en la FIG. 3. El mapa de intercambio de calor deuterio de cada anticuerpo en el dominio saposina de la proteína ASM se muestra en la FIG. 4.

TABLA 8

Anticuerpo#	Región Péptido	Secuencia de Aminoácido
#9101	135-159	PTVPKPPPKPPSPAPGAPVSRILF

#9102	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
	218-228	SGLGPAGPFDM
#9104	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-159	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF
#9108	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9113	53-72	TAINLGLKKEPNVARVGSVA
	101-123	VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH
	135-155	PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS
	259-269	VRKFLGPVPVY
#9123	259-269	VRKFLGPVPVY

Como se exhibe en la Tabla 8 y FIG. 3, los anticuerpos conforme a la presente revelación se unieron al fragmento de aminoácidos en las posiciones 53 a 72 (SEC ID NO: 68, TAINLGLKKEPNVARVGSVA), el fragmento de aminoácidos en las posiciones 101 a 123 (SEC ID NO: 69, VWRRSVLSPSEACGLLLGSTCGH), el fragmento de aminoácidos en las posiciones 135 a 159 (SEC ID NO: 70, PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVSRILF), el fragmento de aminoácidos en las posiciones 135 a 155 (SEC ID NO: 71, PTVPKPPPKPPSPPAPGAPVS), el fragmento de aminoácido en las posiciones 218 a 228

(SEC ID NO: 72, SGLGPAGPFDM), o el fragmento de aminoácidos en las posiciones 259 a 269 (SEC ID NO: 73, VRKFLGPVPVY) del término N de la proteína ASM. Especialmente, como se exhibe en la FIG. 4, los anticuerpos conforme a la presente revelación se unieron principalmente a un α -helix 1 y α -helix 2 en el dominio saposina.